

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

枯草菌孢子形成母細胞の栄養細胞への脱分化

著者	住吉 泰樹
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	59
ページ	1-2
発行年	2018-03-31
URL	http://doi.org/10.15002/00021625

枯草菌孢子形成母細胞の栄養細胞への脱分化

DEDIFFERENTIATION OF SPORULATING MOTHER CELL INTO VEGETATIVE CELL IN *BACILLUS SUBTILIS*

住吉泰樹

Taiki SUMIYOSHI

指導教員 佐藤勉

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Bacillus subtilis cell forms a spore in response to nutrient starvation. During sporulation, cells differentiate into two types, the mother cell and the forespore. More than 150 genes are involved in sporulation, and their expression is spatiotemporally controlled by sigma factors. Once sporulation progresses to Stage II where an asymmetric septum is formed in the cell, the mother cell can not return to vegetative cell afterwards (called commitment) even if the nutritional condition improves, and finally lyses. In this study, I tried to dedifferentiate the mother cells after commitment to vegetative cells and found that they elongated and divided by expressing *sigA* (encoding σ^A , a major sigma factor during vegetative growth) in the mother cell compartment during late sporulation. These results suggest that terminally differentiated cell such as mother cell of spore-forming bacteria can dedifferentiate into vegetative cell by expressing the major sigma factor gene.

Key Words : sporulation, mother cell, commitment, sigma factors, dedifferentiation

1. 緒言

動物細胞では iPS 細胞の作製、植物細胞ではカルスの誘導により、脱分化細胞を作製する方法が確立されている。しかし、細菌では脱分化についての報告はほとんどない。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は栄養源が枯渇すると細胞内に孢子を形成する。孢子形成細胞は、それぞれ同一のゲノムを持つフォアスポア (孢子) と、フォアスポアを包む母細胞に分かれている。枯草菌の孢子形成過程は、フォアスポア側で σ^F から σ^G 、母細胞側で σ^E から σ^K という順に、 σ 因子が逐次的に活性化し、遺伝子発現を時間空間的に制御することで進行している。この機構をシグマカスケードと呼ぶ (図 1) [1]。また、最終分化細胞である母細胞では、*spsM* 遺伝子が SP β プロファージによって分断されているが、孢子形成期における SP β の切り出しに伴って *spsM* 遺伝子が再構築することが明らかとなっている[2]。さらに、細胞内に非対称隔膜が形成される Stage II まで孢子形成が進行すると、母細胞はそれ以降、栄養条件が好転しても栄養細胞に戻ることができない。この機構をコミットメントと呼ぶ[3]。このような背景から、枯草菌の孢子形成母細胞は、単細胞レベルの細胞分化の最小モデル系として解析が進められている。本研究は、細菌における脱分化の証明を目的とし、コミットメント後の母細胞を栄養細胞に戻すことが可能であるか解析を試みた。

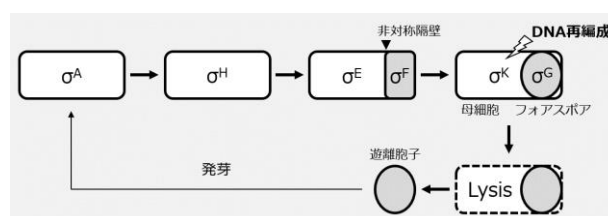


図 1 枯草菌のシグマカスケード

2. 実験方法

(1) 枯草菌の栄養条件好転

枯草菌株を孢子形成培地で培養し、栄養条件を好転させたい時期において菌体を回収した。その後、栄養豊富な培地に再懸濁し、培養を再開した。

(2) β -galactosidase assay

枯草菌株を孢子形成培地で培養しながら吸光度 (OD₆₀₀) を測定し、孢子形成開始時点である T₀ を判断した。T₀ から T₉ までの菌体を回収し、 β -galactosidase 活性を測定した。

3. 実験結果と考察

(1) 孢子形成母細胞の脱分化

まず、枯草菌野生株を孢子形成培地で培養し、非対称隔膜の形成が完了した Stage II の時点で、栄養豊富な培地に移して培養を続けた。経時的に顕微鏡観察を行った結果、母細胞は伸長せず、孢子形成が進行した。次に、レポータ

アッセイによって、胞子形成期における σ^A (栄養増殖期主要 σ 因子) および σ^K (胞子形成後期 σ 因子) の活性を調べた。その結果、 σ^A は胞子形成期に入ると急激に活性が低下し、 σ^K は胞子形成開始から 4 時間後より活性が上昇した。これらのことから、コミットメント決定後の母細胞が栄養細胞に戻ることができない、すなわち脱分化不可能であるのは、胞子形成期に σ^A の活性が減少し、栄養増殖に関する遺伝子の転写が抑制されてしまうためであることが示唆された。そこで、枯草菌野生株の *thrC* 領域に σ^K 誘導プロモーターおよび σ^A をコードする *sigA* を導入し、コミットメントが完了している胞子形成後期に母細胞側で σ^A が発現する株である $P\sigma^K$ -*sigA* 株を作製した。この株を胞子形成培地で培養し、 σ^A 再発現後の胞子形成開始 8 時間後に蛍光顕微鏡観察をしたところ、母細胞の伸長が確認された。また、この時点で栄養条件を好転させて培養を続け、経時的に蛍光顕微鏡観察を行ったところ、伸長した母細胞の内部に隔壁が存在するものも見られた (図 2)。以上のことから、コミットメント決定後の胞子形成母細胞において、栄養増殖期主要 σ 因子である σ^A を発現させることで、母細胞が栄養細胞に戻ることが示唆された。

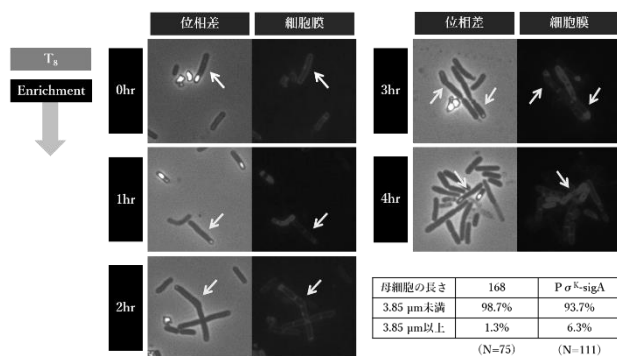


図2 $P\sigma^K$ -*sigA* 株の胞子形成母細胞の脱分化

(2) 脱分化誘導細胞の検出

胞子形成母細胞では、 $SP\beta$ の欠失により *spsM* 遺伝子が再構築される。まず、栄養条件好転後の脱分化誘導株 $P\sigma^K$ -*sigA* のゲノム DNA に対して PCR を行い、脱分化した母細胞のゲノムにおいても $SP\beta$ が欠失していることを確認した。次に、母細胞からの脱分化細胞を検出するため、 $SP\beta$ の欠失により *gfp* 遺伝子が発現する系を脱分化誘導株に導入した。なお、この系における $SP\beta$ は、組換えユニットである *sprA* と *sprB* および Spectinomycin 耐性遺伝子のみを保持している $SPmini$ に置換した。この株に対して蛍光顕微鏡観察を行ったところ、胞子形成後期の母細胞および母細胞から脱分化した一部の栄養細胞において GFP 蛍光が確認された (図 3)。しかし、 $SPmini$ の切り出しによって失われるはずの Spectinomycin 耐性を保持したままであるというデータが別の実験から得られた。このことから、欠失した $SPmini$ が母細胞ゲノムへ再挿入されていることが推測された。

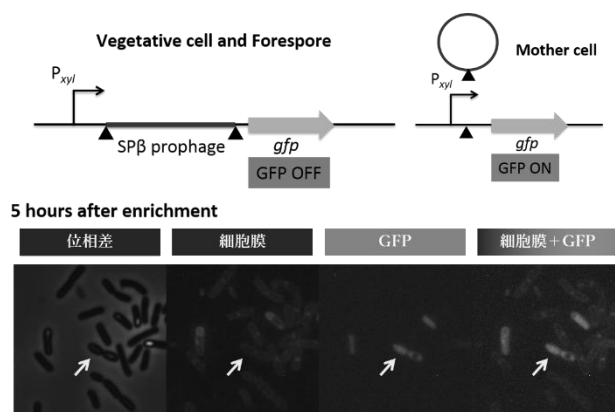


図3 識別システムを利用した脱分化細胞の検出

(3) $SP\beta$ の Re-integration

近年、*sprB* 遺伝子にコードされている SPB タンパク質が、胞子形成特異的 σ 因子である σ^E および σ^K によって連続的に発現し、 $SP\beta$ の母細胞ゲノムへの再挿入 (Re-integration) を抑制していることが明らかとなった[4]。本実験の場合、栄養条件の好転により SPB のはたらきが抑えられたことで、 $SPmini$ が再挿入されたと考えられた。そこで、脱分化誘導株 $P\sigma^K$ -*sigA* のゲノム上に異所的な *attB* site と $SPmini$ を導入し、 $SPmini$ の再挿入により *lacZ* が発現する株である $P\sigma^K$ -*sigA* *amyE* 株を作製して、カラーセクションおよび PCR による Re-integration の検出を試みた。実際にこの株を胞子形成開始 6 時間後に X-Gal および IPTG を含む培地に塗布したところ、コロニーの色が White から Pale Blue に変化したものが得られた。また、Pale Blue コロニーからゲノムを抽出し、 $SPmini$ の再挿入を検出するための PCR を行ったところ、異所的な *attB* site からの切り出しおよび native な *attB* site への再挿入が確認された。従って、胞子形成期に切り出された $SP\beta$ は、栄養条件の好転によって母細胞ゲノムに再挿入されることが示唆された。また、Re-integration が検出されたことから、母細胞由来の脱分化栄養細胞の存在が認められた。

4. 結言

胞子形成後期の母細胞において、 σ^K プロモーターからの転写によって *sigA* を発現させることで、母細胞が栄養細胞へと脱分化することが示唆された。また、 $SP\beta$ の胞子形成母細胞特異的切り出しを利用した、母細胞由来の脱分化細胞の検出システムを構築し、さらに、脱分化誘導株における栄養条件好転後の $SP\beta$ の Re-integration を検出した。

参考文献

- 1) Li Z. and Piggot PJ. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 12538-43.
- 2) Abe K. et al. (2014) *PLoS Genet*. **10**: e1004636.
- 3) Parker GF. et al. (1996) *Microbiol*. **142**: 3445-52.
- 4) Abe K. et al. (2017) *Nucleic Acids Res*. **45**: 6669-6683.